

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE MEDICINA PREVENTIVA

**AISLAMIENTO DE *ESCHERICHIA COLI* Y DE *ENTEROCOCCUS SPP* DESDE EL
CONTENIDO RECTAL DE BOVINOS**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO

MARÍA PAULINA FRY BRAVO

VALDIVIA – CHILE

2004

PROFESOR PATROCINANTE

Dra. Erika Gesche R.

Nombre

Firma

PROFESOR COLABORADOR

T.M. Mónica Sáez L.

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Fernando Wittwer M.

Nombre

Firma

Dr. Heriberto Fernández J.

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACION:

10 de Mayo de 2004

2. INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	16
DISCUSION	18
BIBLIOGRAFIA	22
ANEXOS	27
AGRADECIMIENTOS	31

3. RESUMEN

Aislamiento de *Escherichia coli* y de *Enterococcus spp.* desde el contenido rectal de bovinos

Actualmente, la sanidad e inocuidad de los alimentos, así como también la resistencia que se ha desarrollado frente a los agentes antimicrobianos, han adquirido gran importancia. *Escherichia coli* y *Enterococcus* son utilizados como indicadores de contaminación fecal y también de resistencia a antibióticos, por esto el objetivo de este estudio consistió en la determinación de la frecuencia de aislamiento de estas dos bacterias. El aislamiento se realizó a partir de 117 muestras de materia fecal de bovinos aparentemente sanos obtenidas en la sala de vísceras verdes de una planta faenadora de carnes de la ciudad de Valdivia y analizadas en el Laboratorio de Alimentos de la Universidad Austral de Chile. Para el aislamiento de *E. coli* se utilizó el agar MacConkey N° 3 y para *Enterococcus* se usó el agar Enterococcosel. Luego ambas bacterias fueron sometidas a pruebas bioquímicas para su confirmación y, en el caso de *Enterococcus*, para la determinación de las especies *E. faecalis*, *E. faecium* y *Enterococcus spp.*

La frecuencia de aislamiento de ambas bacterias resultó baja, principalmente *Enterococcus* que sólo alcanzó un 23,9% de muestras positivas, dejando en evidencia su baja presencia en heces de bovinos adultos. Por otra parte, *E. coli* resultó ser 2,8 veces más abundante que *Enterococcus* al presentarse en un 67,5% de las muestras analizadas lo que refleja su mejor uso como indicador de contaminación fecal. Dentro de las 28 muestras positivas a *Enterococcus* obtenidas, únicamente dos fueron identificadas como *E. faecalis* y sólo una como *E. faecium*, el resto se clasificó como *Enterococcus spp.*

Las muestras analizadas para cada bacteria se asociaron a las variables de procedencia (provincia) y sexo de los animales. *E. coli* presentó algunas diferencias ($p < 0,05$) entre las provincias de origen las cuales no son concluyentes. *Enterococcus* en cambio, no presentó diferencias ($p > 0,05$). En el caso de la variable de la asociación a la variable de sexo de los bovinos muestreados no se presentaron diferencias ($p > 0,05$) por parte de ninguna de las bacterias indicadores lo que permite concluir que las variables consideradas no tienen relación con la frecuencia de aislamiento.

Palabras claves: *Escherichia coli*, *Enterococcus*, materia fecal, bovinos.

4. SUMMARY

Isolation of *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* from bovine rectal contents.

Given the great importance of innocuously in food supplies, as also in the resistance that the pathogen microorganisms have developed against antimicrobial agents, the main objective of this study was the determination of the presence of *Escherichia coli* and *Enterococcus* in bovine feces as indicators of faecal contamination and resistance to antibiotics. The isolation of the bacteria was done from 117 samples of feces of bovines in apparent good health condition originary from four province of southern Chile. This samples were obtained from a slaughterhouse in Valdivia and were analysed in the Food Laboratory at the Universidad Austral de Chile. MacConkey agar N° 3 was used for the isolation of *E. coli*, and for *Enterococcus* the Enterococcosel agar was used. Later, biochemical tests were applied for the confirmation of both bacteria and for the identification of the *Enterococcus* species (*E. faecalis*, *E. faecium* and *Enterococcus spp.*).

The presence of both bacteria in bovine feces was low. The 23,9% of *Enterococcus* positive samples reflects his low presence in adult bovines. On the other hand, *E. coli* was 2,8 times more abundant than *Enterococcus* with a 67,5% of positive samples, being a better indicator of faecal contamination than *Enterococcus*. Only two samples of *Enterococcus* were identified as *E. faecalis* and only one as *E. faecium* from all the 28 positive samples. The rest was identified as *Enterococcus spp.*

The variables of origin (province) and sex of the bovines were associated to the positive samples of each bacteria. *E. coli* positive samples showed some differences ($p < 0,05$) which were inconclusive between the provinces of origin. *Enterococcus* didn't show differences for this variable ($p > 0,05$). None of this two indicator bacteria showed differences ($p > 0,05$) in the association of the positive samples with the sex variable of the bovines. This leaves to the conclusion that there isn't an association between the variables and the presence of the bacteria.

Keywords: *Escherichia coli*, *Enterococcus*, feces, bovine

5. INTRODUCCION

5.1. ANTECEDENTES GENERALES

Los microorganismos están presente en el ambiente natural del hombre (agua, suelo, aire, etc.), en el propio hombre y en todos los seres vivos de los que el hombre se alimenta. De hecho, cualquier producto alimenticio, transformado o no, que el hombre consume, puede estar contaminado con microorganismos (Bourgeois y col, 1994).

Según el tipo de microorganismo implantado, la contaminación puede tener consecuencias más o menos importantes, desde una simple alteración del producto, haciéndole perder sus características organolépticas o su valor comercial, hasta la producción de una intoxicación o toxiinfección grave en el consumidor (Bourgeois y col, 1994).

Una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA) ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como: *“cualquier enfermedad de naturaleza infecciosa o tóxica producida, o que se piensa sea producida por el consumo de alimentos o agua”* (Adams y Moss, 2000).

La primera intoxicación alimentaria, descrita por el alemán J. Kerner, data de 1820 y se debió a una “intoxicación por embutidos” que causó una alta mortalidad (Jay, 1992). Los microorganismos capaces de causar enfermedad en el hombre son las bacterias, virus y parásitos, siendo las bacterias las de mayor importancia debido al alto número de personas que afecta y a la gravedad de los cuadros que producen (Beuchat, 1996).

La farmacología juega un papel importante en el tratamiento de estos cuadros. Esta se define como “el estudio de sustancias que interactúan con sistemas vivos a través de procesos químicos, especialmente por medio de la unión a moléculas regulatorias activando o inhibiendo los procesos corporales normales” (Katzung, 2001). La farmacología y la medicina han evolucionado juntas a través de la historia lo que se refleja en los medicamentos mismos. Los más antiguos se obtenían de plantas, minerales y órganos de animales. Los más recientes tienden a ser sintéticos y específicos en su acción (Fuentes, 1992). Uno de los momentos más significativos y trascendentales de la farmacología está marcado por el advenimiento de la quimioterapia ya que por primera vez se lograba una terapia etiológica-específica de las enfermedades infecciosas e infectocontagiosas (Castagneto, 1980).

Pasteur y Joubert fueron los primeros investigadores en reconocer el potencial de productos microbiológicos como agentes terapéuticos cuando, en 1877, publicaron sus observaciones de microorganismos comunes que inhiben el crecimiento de *Bacillus anthracis* en orina (Chambers, 2001). Sin embargo, la quimioterapia moderna se atribuye al químico del siglo XIX, Paul Ehrlich, quien dedicó su vida a descubrir agentes con toxicidad selectiva o tóxicas, como él las llamó, por tener afinidad por un determinado tejido y actuar como “balas

mágicas que buscan por sí mismas su blanco”. Pero no fue sino con el descubrimiento de la penicilina por Fleming y su posterior purificación por Chain y Florey lo que condujo al desarrollo de la revolución antibiótica en los años 40. Desde entonces se han descubierto numerosas clases de antimicrobianos los cuales tienen propiedades diferentes a las de sus antecesores (Mardones, 1979; Prescott y Baggot, 1988; Biberstein y Zee, 1994; Chambers, 2001; Lee y Lin, 2003).

En el estricto sentido de la palabra, los antimicrobianos son sustancias producidas por varias especies de microorganismos o en forma semisintética que, a bajas concentraciones, inhiben el crecimiento, impiden la replicación o matan a otros microorganismos. Generalmente el uso de la palabra “antibiótico” incluye también a aquellos agentes de origen sintético (Prescott y Baggot, 1988; Wanamaker y Pettes, 2000; Chambers, 2001).

En términos generales, los antibióticos se clasifican en categorías según su espectro de acción existiendo de amplio y de bajo espectro. La sensibilidad a antibióticos tiene 3 requisitos: un objetivo o “blanco” de acción, un mecanismo de transporte hacia la célula antes de que el antibiótico comience a actuar y ausencia de enzimas que puedan inactivar, modificar o destruir el producto (Neu, 1992; Lukasova y Sustackova, 2003).

En veterinaria, el uso terapéutico de estos agentes ha sido posterior a su uso en medicina humana debido al alto costo de su obtención (Biberstein y Zee, 1994). Actualmente los agentes antimicrobianos son usados en forma terapéutica para el tratamiento de infecciones bacterianas, en forma preventiva en animales en riesgo de enfermar por una infección bacteriana y en forma de aditivos para aumentar la eficiencia de conversión y el crecimiento del animal o el rendimiento del producto alimenticio y para modificar la composición nutritiva del producto animal. Tanto para el uso de los antibióticos en forma terapéutica como preventiva y subterapéutica se pueden aplicar en forma individual o masiva a un grupo de animales por medio del agua de bebida o los alimentos que ellos consumen (National Research Council, 1999; Bogaard, van den y Stobbering, 1999a).

El término “promotores de crecimiento” es usado para aditivos alimentarios, distintos a nutrientes, que aumentan la tasa de crecimiento y/o mejoran la eficiencia de conversión en animales sanos alimentados con una dieta balanceada. Estos están aplicados especialmente en la crianza intensiva de animales de carne (Gesche y Emilfork, 1998; Bogaard, van den y Stobberingh, 1999a; National Research Council, 1999). En el caso de los animales de leche, los antibióticos son usualmente usados para el tratamiento de las mastitis clínicas o subclínicas durante el período de lactancia o bien como tratamiento o prevención en el período de secado (Lukasova y Sustackova, 2003).

El uso extensivo e indiscriminado de los antibióticos en hombres, animales y su expansión en la agricultura, la automedicación de las personas o de éstos a sus animales y la subdosificación, han traído consecuencias negativas como, por ejemplo, la presencia de residuos de estas sustancias en los productos de origen animal destinados a consumo humano, sensibilidad a ciertos antibióticos lo que se manifiesta con reacciones de hipersensibilidad, inhibición de flora normal y excreción prolongada de patógenos entéricos, pero no cabe duda

que el mayor problema recae en la generación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos (Linton, 1983; Okolo, 1986; Fuentes, 1992; Lee y Lin, 2003).

De acuerdo a la OMS la resistencia antibiótica es la capacidad de la población bacteriana de sobrevivir al efecto inhibitorio de los agentes antimicrobianos (Lukasova y Sustackova, 2003). Estudios realizados antes de la era antibiótica han revelado que genes con codificación para resistir la terapia con distintos agentes antibióticos estaban ya presentes pero no se hicieron notorios hasta que los antibióticos estuvieron disponibles. Una vez que se comenzaron a usar, las pocas cepas resistentes presentes eran seleccionadas a costa de la eliminación de las cepas sensibles por el uso del quimioterápico. Esto, sumado a la posibilidad de intercambio genético entre las bacterias y a su corto tiempo de generación, hicieron que estas cepas fueran cada vez más abundantes (Linton, 1983; Biberstein y Zee, 1994).

Algunas cepas bacterianas son resistentes a varios antibióticos lo que se conoce como “resistencia múltiple”. Este fenómeno puede ocurrir entre organismos patógenos, entre organismos de distintas especies e incluso entre bacterias patógenas y no patógenas (Okolo, 1986). La resistencia múltiple adquirida limita el uso de muchos antibióticos en forma importante en especies de la familia *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Proteus* (Biberstein y Zee, 1994).

Es precisamente la familia *Enterobacteriaceae*, junto a otros géneros como *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, etc., los miembros de la flora normal de hombres y animales (Bourgeois y col, 1994). Todos los animales sanos tienen una flora microbiana muy compleja, de la cual una parte está adaptada para crecer y sobrevivir en el hospedador y otra parte es transitoria reflejando la interacción inmediata del animal con su medio ambiente. Los animales albergan microorganismos que pueden causar ETA encontrándose en la cavidad nasal y garganta, piel o lesiones cutáneas, pelos o plumas y en el tracto digestivo (Banwart, 1979; Adams y Moss, 2000).

El intestino es el sitio principal donde se desarrolla la transferencia de la resistencia a antibióticos debido tanto a la alta densidad de bacterias presentes en él como a las oportunidades de difusión en los animales con crianza intensiva quienes tienen un contacto estrecho (Biberstein y Zee, 1994; Bogaard, van den y Stobberingh, 1999a).

Lukasova y Sustackova (2003) señalan que algunos estudios han demostrado que el nivel de resistencia ha aumentado no sólo en bacterias patógenas sino también en bacterias comensales. Estas últimas constituyen un reservorio de genes resistentes para bacterias patógenas y su nivel de resistencia es considerado como un buen indicador de la presión de selección ejercida por el uso de antibiótico y de los problemas de resistencia esperados en bacterias patógenas. El monitoreo de la prevalencia de resistencia en bacterias indicadoras como *E. coli* y *Enterococcus* en diferentes poblaciones, animales, pacientes y humanos sanos hace factible comparar la prevalencia de resistencia y detectar transferencias de bacterias o genes resistentes desde animales a humanos o viceversa.

E. coli y *Enterococcus* son también microorganismos indicadores de la condición microbiana censurable de los alimentos como contaminación fecal, presencia de potenciales patógenos, así como también de las condiciones sanitarias en el procesamiento, producción o almacenamiento de los alimentos (Banwart, 1979; Venegas y col, 1990; Doyle y col, 1997). Sin embargo el uso actual de estos microorganismos está dirigido, con mayor frecuencia, hacia la evaluación de la inocuidad de los alimentos a través de la cuantificación de *E. coli* o *Enterococcus* como indicadores de la calidad sanitaria (Jay, 1992).

5.2. *ESCHERICHIA COLI*

Esta bacteria ha sido usada como indicador de contaminación fecal por aproximadamente 100 años. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* la cual está distribuida por todo el mundo. Se encuentran en el suelo, el agua, la vegetación y formando parte de la flora bacteriana normal de casi todos los animales, desde insectos al hombre (Sneath y col, 1984; Murray y col, 1992).

Como características generales de la familia *Enterobacteriaceae* se puede decir que son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, cuyo tamaño varía entre 0,3-1.0 x 1.0-6.0 μm . Móviles por medio de flagelos peritricos o inmóviles. Capsulados o no capsulados. No forman esporas. Crecen bien en medios corrientes y agar MacConkey. Suelen ser necesarias de 18 a 24 horas de incubación para su crecimiento en diversos medios selectivos y no selectivos. Poseen necesidades nutritivas simples. Producen ácido a partir de la fermentación de la glucosa, en donde puede o no haber producción de gas. Son catalasa positiva, oxidasa negativa y convierten los nitratos en nitritos. Algunos géneros fermentan la lactosa lo que se usa como método de diferenciación (Cowan, 1974; Merchant y Packer, 1975; Sneath y col, 1984; Murray y col, 1992; Robinson y col, 2000).

E. coli se caracteriza por ser un bacilo recto de 1.1-1.5 x 2.0-6.0 μm , individuales o en pares. Móviles por flagelos peritricos o inmóviles. Su temperatura óptima es 37 °C con un rango que va de los 15 °C a los 45 °C, el pH óptimo es de 7 tolerando grandes variaciones y posee una actividad de agua (a_w) mínima para crecer de 0.95. Es catalasa positiva, oxidasa negativa, produce ácido y gas a partir de glucosa, lactosa y otros carbohidratos, reduce los nitratos a nitritos y no produce H₂S (Merchant y Packer, 1975; Sneath y col, 1984; Robinson y col, 2000).

Fue aislada por primera vez por el alemán Theodor Escherich en 1885 de material fecal de niños, mostrando una notable capacidad para colonizar a su hospedador (Robinson y col, 2000). Es el habitante universal del tracto intestinal del hombre y otros animales de sangre caliente en donde es la bacteria anaerobia facultativa predominante, sin embargo constituye un porcentaje pequeño del total de la microbiota (menos del 1%) (Adams y Moss, 2000; Robinson y col, 2000). Cumple una función importante en el organismo suprimiendo el crecimiento de bacterias dañinas y sintetizando apreciables cantidades de vitaminas. A pesar de esto, hay tipos de *E.coli* capaces de producir enfermedad en el hombre (FDA, 2002).

Escherichia coli es la causa más frecuente de algunas de las infecciones bacterianas más comunes, como la de las vías urinarias, meningitis neonatal, infecciones respiratorias y gastroenteritis. La población de mayor riesgo la constituyen las personas jóvenes y los adultos mayores. La prevalencia es mayor en niños menores de 5 años de edad, lo que va disminuyendo con el tiempo, para después volver a aumentar en personas de 65 años o más (Murray y col, 1992).

La clasificación serológica de las enterobacterias se basa en los tres grupos principales de antígenos: lipopolisacárido somático O, antígenos capsulares K y antígenos proteicos H presentes en los flagelos bacterianos. La composición antigénica de *E. coli* es compleja, con más de 170 antígenos O, 56 antígenos H y numerosos antígenos K (Murray y col, 1992).

A pesar de ser una bacteria habitual del tracto intestinal, hay serogrupos que son patógenos. Las cepas de *E.coli* que producen diarrea se clasifican en grupos específicos basados en la virulencia, patogenicia, signos clínicos y distintos grupos serológicos O: H. Estas categorías son: *E.coli* enteropatógeno (ECEP) del cual el hombre es reservorio importante; *E.coli* enterotoxigénico (ECET); *E.coli* enteroinvasiva (ECEI); *E.coli* enteroagregativa (ECEAg); *E.coli* enteroadherente (ECEA) y *E.coli* enterohemorrágica (ECEH) (Venegas, 1990; Doyle y col, 1997).

Por muchos años se ha sabido que los rumiantes aparentemente sanos albergan transitoriamente al patógeno humano *Escherichia coli* enterohemorrágico O157: H7 en sus tractos gastrointestinales. Aunque se ha señalado al ganado bovino, ovejas, ciervos y cabras como reservorio de este patógeno, el ganado bovino es la fuente principal de la infección en humanos (Grauke y col, 2002). También se describen como reservorios a pavos, cerdos, corderos, perros, gatos, caballos y experimentalmente a polluelos (Beuchat, 1996; Doyle y col, 1997; Yilmaz y col, 2000).

Se ha determinado que *Escherichia coli* se presenta en altas cantidades en el tracto gastrointestinal inferior de todos los mamíferos, específicamente en ciego, colon y recto. Se señala también al colon como el sitio de permanencia y proliferación en rumiantes adultos. (Rice y col, 1990; Grauke y col, 2002)

El hombre también se señala como portador, siendo importante el contagio persona-persona por el contacto directo fecal-oral principalmente en lugares de gran hacinamiento como son los jardines infantiles y hogares de ancianos (Grauke y col, 2002)

Las vías de transmisión para el cuadro gastrointestinal incluyen el contacto fecal-oral entre humanos y el consumo de agua o alimentos contaminados (Forbes y col, 1998). Los brotes han sido asociados a una gran variedad de alimentos como son la carne cruda o poco cocida, hamburguesas, variados vegetales como la lechuga y el melón, sidra de manzana, mayonesa, salame, leche cruda, cuajo de queso, agua sin tratar, etc. Pero la mayoría de los brotes son asociados al consumo de carne mal cocida o cruda principalmente de bovino (Cullor, 1995; Doyle y col, 1997; FDA, 2002; Solomon y col, 2002). Los lugares donde más

comúnmente ocurren brotes en colegios o escuelas, restaurantes, centros de cuidados y enfermerías (MacDonald y col, 1988; Cullor, 1995).

Se ha encontrado una alta frecuencia de resistencia antibiótica en enterobacterias, tanto en la flora normal presente en las heces como en muestras clínicas (Österblad y col, 2000). La incidencia de resistencia bacteriana varía también entre especies animales y entre distintas especies de bacterias que componen la flora intestinal, siendo *E. coli* la más estudiada (Linton, 1983). Existe relación entre el grado de resistencia y la frecuencia del uso de los agentes antimicrobianos. En el caso de los rumiantes adultos y de animales mantenidos en pradera, la cantidad de cepas resistentes de *E. coli* es escasa. Animales jóvenes y animales criados en forma intensiva presentan una prevalencia de resistencia mucho mayor. Esta prevalencia disminuye con la edad debido a que la flora ruminal reemplaza a la flora convencional de los animales jóvenes eliminando las cepas resistentes. Estas cepas pueden, sin embargo, persistir en el animal y en el medio ambiente y subsecuentemente formar parte de la flora normal de otros animales sin que éstos hayan recibido necesariamente terapia antibiótica (Linton, 1983; Radostits y col, 2000).

En el intestino los plásmidos de resistencia están en las cepas de *Escherichia coli* y en la flora anaerobia predominante del intestino grueso. Luego de tratar a un animal con un antibiótico determinado *E. coli* y parte de la flora anaerobia se vuelven resistentes como consecuencia de la selección de cepas resistentes y, en menor grado, por la transferencia de plásmidos de resistencia. Esta cantidad de bacterias resistentes disminuye una vez que se deja de aplicar el antibiótico debido a que *E. coli* portadores de plásmidos de resistencia no son buenos colonizadores del intestino. Esto cambia cuando el uso de antibióticos es continuo en el tiempo. El uso de antibióticos orales en animales domésticos por tantos años y la transferencia de los plásmidos de resistencia entre la flora intestinal ha producido multiresistencia en serotipos O de *E. coli* (Linton, 1983; Biberstein y Zee, 1994).

Escherichia coli se puede diferenciar de otras enterobacterias por test bioquímicos. Las pruebas bioquímicas más comúnmente usadas son las conocidas como IMViC. Las reacciones de estas pruebas son: Indol y Rojo de metilo positivo, Voges Proskauer y Citrato negativo (Jay, 1992). Otra prueba bioquímica consiste en el uso del agar hierro tres azúcares (TSI) que determina la fermentación de glucosa y lactosa o sacarosa, la formación de gas y H₂S por parte de bacilos Gram negativos. *E. coli* presenta una reacción ácida sobre ácida (fermentación glucosa y sacarosa y/o lactosa) con formación de gas (Forbes y col, 1998).

5.3. ENTEROCOCCUS

Las especies del género *Enterococcus* son cocos Gram positivos, generalmente de forma esférica u ovoide, de menos de 2 µm de diámetro. Se encuentran solos, en pares o formando cadenas y generalmente son inmóviles. No forman endosporas, son catalasa negativos, hidrolizan la esculina, fermentan los hidratos de carbono para producir principalmente ácido láctico pero no gas. Sus requerimientos nutricionales son complejos y variables (Sneath y col, 1984; Jay, 1992; Robinson y col, 2000). La mayoría son anaerobias facultativas y mesófilas,

pero existen especies con rangos o características distintas. En la naturaleza son no pigmentados y microaerofílicos. Tienen la capacidad de crecer a temperaturas que varían entre 10-45°C, en medios con 6,5% de NaCl, a un pH de 9.6 y un 40% de bilis. Sobreviven a la temperatura de 60°C por 30 minutos, y presentan el antígeno del grupo D. Algunas bacterias de otros grupos o géneros, cumplen con alguna de estas características, por lo tanto es necesario una diferenciación más específica (Jay, 1992; Hardie y Whiley, 1997; Robinson y col, 2000).

Los enterococos han sido reconocidos desde que Thiercelin, en 1899, los describió como “enterocoque” enfatizando su origen intestinal. A pesar de esto, la taxonomía de este grupo ha sido siempre un poco vaga. El género *Streptococcus* fue dividido en los años ochenta en tres géneros distintos: *Enterococcus*, formado por miembros del grupo D de Lancefield, *Lactococcus* y *Streptococcus sensu stricto* que incluye la mayoría de las especies. Consecuentemente algunas especies fueron cambiadas de género como ocurrió con *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus avium* y *Streptococcus gallinarum*, actualmente pertenecientes al género *Enterococcus*. Posteriormente, se realizaron otros cambios taxonómicos y se incluyeron nuevas especies a este género, alcanzando actualmente un total de 20 especies distribuidas en 5 grupos reconocidos del I al V (Devriese y col, 1993; Hardie y Whiley, 1997; Robinson y col, 2000; Tyrrell y col, 2002).

El origen primario de *Enterococcus spp* es el fecal, ya sea del intestino del hombre o de los animales de sangre caliente. Son prevalentes en el cuero, pelo, plumas y pezuñas de los animales y, una vez faenados, se pueden encontrar en los equipos, manos de los trabajadores y productos alimenticios (Banwart, 1979). La transmisión de estas bacterias puede ser por contacto fecal-oral, el contacto con fluidos corporales de animales y contacto con superficies contaminadas (Lukasova y Sustackova, 2003).

Los enterococos se encuentran en el suelo, en los alimentos y en el agua. Las especies más comúnmente asociadas a infecciones (*E. faecalis* y *E. faecium*) son flora normal del tracto gastrointestinal humano y del tracto genitourinario de las mujeres (Forbes y col, 1998). Como lo señala Jay (1992), *E. faecium* es asociado mayormente al tracto intestinal del cerdo, por el contrario, *E. faecalis* parece ser más específico al tracto intestinal del hombre. El rango de hospedadores de *E. faecalis* es contradictorio, como lo señala Wheeler y col (2002), ya que se indica que esta bacteria está presente sólo en el intestino de los humanos pero por otro lado se ha señalado que estaría presente también en una amplia gama de animales.

Especies del género *Enterococcus* han surgido recientemente como patógenos asociados a infecciones nosocomiales serias en humanos y pueden ser responsables de diversas afecciones como colecistitis, peritonitis, endocarditis, meningitis, entre otras, que son cada vez más difíciles de tratar debido a la resistencia a antibióticos que han desarrollado (Reinert y col, 1999; García-Garrote y col, 2000).

En este género la resistencia antibiótica puede ser, generalmente, de dos tipos: resistencia intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia intrínseca se presenta en casi todas las cepas y los genes residen, aparentemente, en el cromosoma. La resistencia adquirida

resulta de una mutación en el ADN celular o de una adquisición de nuevos ADN (Knudtson y Hartman, 1993). La resistencia es adquirida con cierta facilidad y los genes resistentes pueden ser transmitidos a otros géneros. *Enterococcus faecalis* ha transferido plásmidos de resistencia a otras especies de *Enterococcus* y a *Listeria monocytogenes*. Por otro lado, los transposones conjugados que posee *Enterococcus faecium* pueden ser transferidos desde bacterias animales a bacterias humanas (Lukasova y Sustackova, 2003).

Una amplia variedad de especies de enterococos ha sido aislada de infecciones humanas, pero *E. faecalis* y *E. faecium* predominan claramente como las especies más comúnmente encontradas (Forbes y col, 1998; Facklam y Collins, 1989). Entre estas dos especies, la primera es la más común, pero la incidencia de infecciones por *E. faecium* va en aumento en los hospitales, lo que se podría asociar a la resistencia adquirida a la vancomicina (Forbes y col, 1998). Comparado con otros cocos Gram positivos de importancia clínica, el género *Enterococcus* es intrínsecamente más resistente a agentes antimicrobianos comúnmente usados en hospitales como son los β -lactámicos, cefalosporinas, lincosamidas y polimixinas, y de mayor importancia es la resistencia adquirida a los amiglicósidos, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, penicilina y ampicilina (Giraffa y col, 1997; Forbes y col, 1998).

Las cepas resistentes a los antibióticos de uso común pueden ser reducidas por medio de la terapia con vancomicina o teicoplanina. El problema surge cuando estas cepas son también resistentes a estos dos últimos antibióticos transformándose en un asunto de gran importancia para la salud pública (Chingwaru y col, 2003). La resistencia a vancomicina se ha asociado al uso intrahospitalario de glicopéptidos y otros agentes antibióticos como las cefalosporinas de 3^a generación y aminoglicósidos. Sin embargo, se han aislado cepas resistentes a vancomicina en personas sin historial de haber sido hospitalizadas o de haber recibido algún tratamiento antibiótico y también de carne, aguas servidas y de animales domésticos y de granja principalmente en Europa. Esto último se ve reflejado en un estudio en que se analizaron bacterias del género *Enterococcus* aisladas de carne de animales distintos. En todas ellas se presentaron cepas resistentes a vancomocina y teicoplanina principalmente en las muestras de carne de pollo y siendo *E. faecium* más resistente que *E. faecalis* (Pavia y col, 2000).

Se ha reconocido que el antibiótico avoparcina selecciona cepas resistentes a vancomicina en la flora intestinal de los animales (Bogaard, van den y Stobberingh, 1999a). La avoparcina es un glicopéptido que actúa en forma similar a la vancomicina y es de uso exclusivo veterinario como promotor de crecimiento, comúnmente en algunos países europeos. Los enterococos resistentes a la vancomicina tienen resistencia cruzada con avoparcina y también con teicoplanina (Lucasova y Sustackova, 2003). Esto se comprueba con el hecho que en países europeos se han aislado cepas resistentes a vancomicina en heces de animales domésticos, humanos sin exposición a hospitales o tratamientos antibióticos y en carne. Diferente es lo que ocurre en Estados Unidos donde no se permite el uso de avoparcina como aditivo alimenticio. En este país no se han registrado cepas resistentes a glicopéptidos en personas sanas, animales comestibles ni en productos cárneos (Bogaard, van den y Stobberingh, 1999b; Harwood y col, 2001)

Entre las especies más utilizadas como indicadores de contaminación fecal, se mencionan *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Para su diferenciación se utilizan reacciones bioquímicas tales como: producción de ácido a partir de melibiosa, melezitosa, L-arabinosa y glicerol en anaerobiosis. También difieren en la fermentación de piruvato, tolerancia al telurito de potasio al 0,04%, reducción de tetrazolium a pH 6.0 y la descarboxilación de tirosina, entre otros (Sneath y col, 1984; Jay, 1992; Robinson y col, 2000).

Se establece como hipótesis de este estudio la existencia de una alta frecuencia de aislamiento de *E. coli* y *Enterococcus*, independiente de la procedencia y sexo de los animales.

El presente estudio forma parte del proyecto FONDECYT N° 1030857* titulado “Monitoreo de la resistencia bacteriana en animales de producción: primer estudio de perfiles de resistencia en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de aves, cerdos y bovinos a nivel nacional”. Los objetivos formulados fueron: determinar la frecuencia de aislamiento de *Escherichia coli* y *Enterococcus* en materia fecal de bovinos faenados en una planta faenadora de carnes y establecer la asociación de los aislamientos de estos indicadores al área de procedencia geográfica y sexo de los animales.

* SAN MARTIN, B., C. BORIE, E. GESCHE, M.A. MORALES. 2003. Monitoreo de la resistencia bacteriana en animales de producción. FONDECYT 1030857.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. MATERIAL

Para el aislamiento de las bacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus*, como indicadores de resistencia a antibacterianos, se tomaron muestras de materia fecal de bovinos aparentemente sanos, faenados en la Empresa Procesadora de Carnes del Sur S.A de la ciudad de Valdivia, fijando como requisito el muestreo de máximo 10 animales de igual predio de origen. Cada muestra consistía en 5-25 g de materia fecal tomada en forma aséptica desde el intestino grueso en la sala de vísceras verdes de la línea de faena de la empresa procesadora de carne. Cada muestra se depositó en un envase de vidrio que contenía 30 ml del medio de transporte Cary and Blair¹ y fueron mantenidas a 4°C para su transporte al Laboratorio de Alimentos de la Universidad Austral de Chile (UACH).

En el período comprendido entre los meses de Mayo y Julio del año 2003 se obtuvieron 117 muestras de materia fecal de bovinos, cuyas características de procedencia se señalan en el cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Provincia de procedencia de los bovinos muestreados.

PROVINCIA	N° de bovinos	% de bovinos
VALDIVIA	12	10,3
OSORNO	54	46,2
LLANQUIHUE	43	36,8
COYHAIQUE	8	6,8
TOTAL	117	100

Las razas predominantes fueron Frisón Negro con un 54,7%, Frisón Rojo con un 20,5% y un 8,6% correspondió tanto a Holstein Friesian como a Hereford. El 16,2% de los bovinos restantes no respondían a características raciales específicas. En cuanto al sexo, los bovinos muestreados se pudieron subdividir en 64 (54,7%) machos, todos correspondientes a la categoría de novillos y 53 (45,3%) hembras, de las cuales 10 (8,5%) correspondieron a vacas y 43 (36,8%) a vaquillas.

¹ BBL

6.2. METODOS

6.2.1. Método de aislamiento de *Escherichia coli* (Carter, 1984a) (Figura 1)

Una vez en el laboratorio de análisis de alimentos de la UACH, se procedía a extraer pequeñas cantidades de materia fecal de cada frasco con la ayuda de tóruas estériles (una para cada muestra). Esto se depositaba en tubos de ensayo con 5 ml de suero fisiológico estéril, se homogeneizaba por medio de un vortex y se sembraba con la misma tórula en placas de agar MacConkey N°3² para luego estriar con asa estéril y obtener colonias aisladas. Las placas se incubaban a 37°C por 24 horas obteniendo como resultado colonias rosadas correspondientes a bacterias lactosa positivas. Se seleccionaban colonias sospechosas aisladas y se traspasaban a agar Plate Count² para asegurar la pureza de la colonia. Después de 24 horas de incubación a 35°C se seleccionaban colonias aisladas para hacer las pruebas bioquímicas de TSI², Indol³, Rojo de metilo³ y Citrato³.

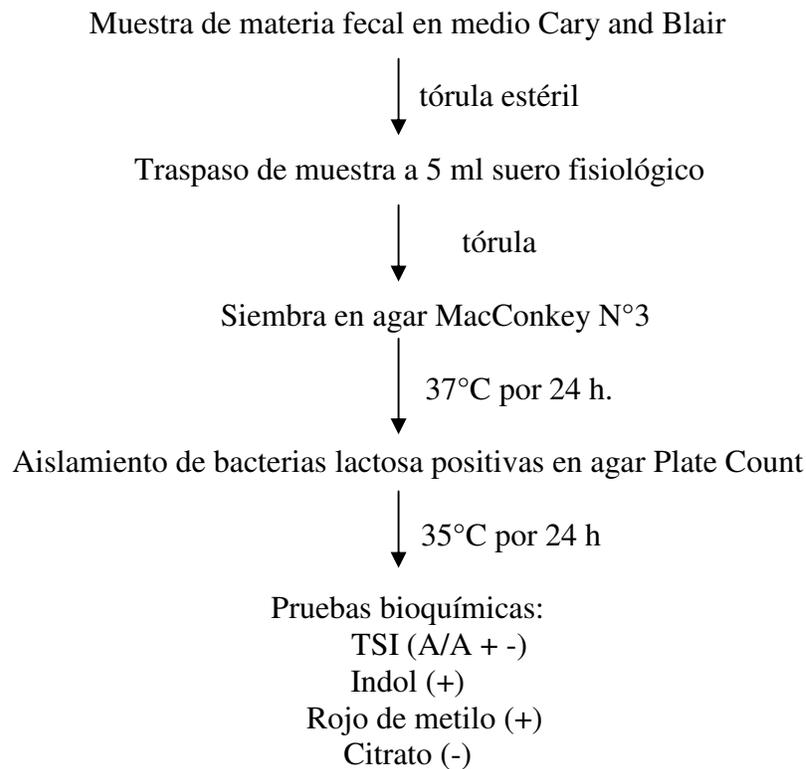


Figura 1. Flujograma del método de aislamiento de *Escherichia coli*

² Laboratorio Oxoid

³ Según Norma Chilena 2636 Of. 2001

6.2.2. Método de aislamiento de *Enterococcus* (Carter 1984b) (Figura 2)

Para el aislamiento de *Enterococcus*, el procedimiento inicial era igual al realizado para *E. coli* sólo que la siembra era realizada en agar Enterococcosel⁴. La lectura de las placas se llevaba a cabo a las 48 horas después de una incubación a 37°C. De estas placas se seleccionaban colonias sospechosas que eran pequeñas, cóncavas, de coloración oscura y con un halo café grisáceo correspondiente a esculina positiva. Estas se pasaban a agar Plate Count para ser nuevamente incubadas por 24 horas. Posteriormente se realizaban pruebas bioquímicas para la determinación de género (*Enterococcus*) y luego pruebas bioquímicas para determinar la especie (*E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus spp*).

Las pruebas para determinar el género consistían en la tinción de Gram, prueba de la catalasa, crecimiento en caldo con una concentración de 6,5% de NaCl⁵ y crecimiento en caldo incubado a 45°C. Las pruebas bioquímicas para determinar la especie consistían en la acidificación de glicerol⁶ incubado en anaerobiosis, acidificación de melibiosa⁶ y arabinosa⁶, reducción de tetrazolium⁷ a pH 6.0 y tolerancia al telurito de potasio⁶ al 0,04% (Kruze, 1983; Devriese y col, 1993; Manero y Blanch, 1999).

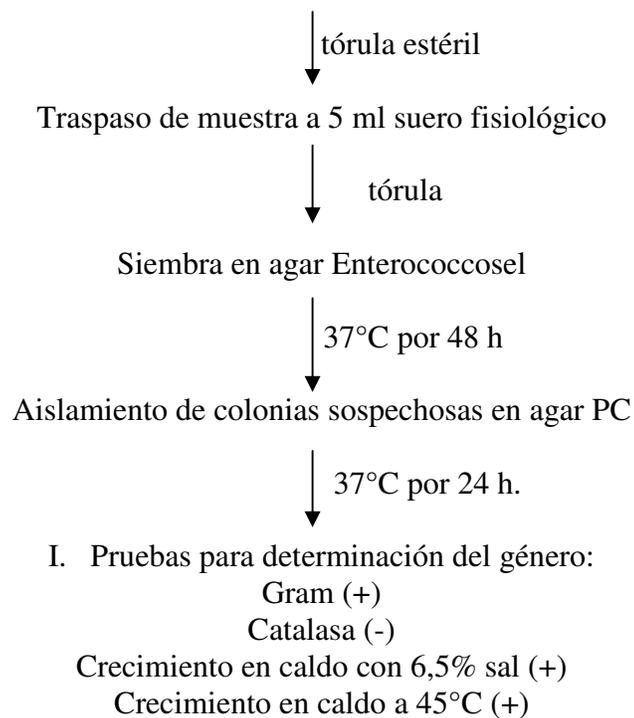
⁴ BBL

⁵ Según Norma Chilena 2658 Of. 2001

⁶ Laboratorio Merck

⁷ Laboratorio Difco

Muestra de materia fecal en medio Cary and Blair



- II. Pruebas bioquímicas para determinación de especies *faecalis*, *faecium* y spp (Cuadro 2):
- Acidificación de Glicerol en anaerobiosis
 - Acidificación de Melibiosa
 - Acidificación de Arabinosa
 - Reducción de Tetrazolium a pH 6,0
 - Tolerancia al Telurito de potasio al 0,04%

Figura 2. Flujograma del método de aislamiento de *Enterococcus*

Cuadro N° 2. Reacciones a pruebas bioquímicas para determinación de especies de *E. faecalis* y *E. faecium*.

	a	b	c	d	e
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	+	+
<i>E. faecium</i>	-	+	+	-	-

6.2.3. Método estadístico

La determinación de la significancia de las diferencias entre las muestras positivas a *E. coli* y *Enterococcus*, de acuerdo a las variables de procedencia y sexo se realizó mediante una prueba de chi cuadrado considerando un nivel de significancia del 95% utilizando el programa computacional Epi Info 6.04.

7. RESULTADOS

7.1. FRECUENCIA DE PRESENTACION DE *E.COLI* Y *ENTEROCOCCUS* (Anexo 1)

Cuadro N° 3. Número y porcentaje de muestras positivas a *E. coli* y *Enterococcus* (n=117).

Bacteria Indicadora	N° de muestras positivas	% del total de muestras
<i>E. coli</i>	79	67,5
<i>Enterococcus</i>	28	23,9

La proporción obtenida entre las muestras positivas a *E. coli* y *Enterococcus* resultó de 2,8: 1.

Cuadro N° 4. Número y porcentaje de muestras positivas a uno o más aislamientos bacterianos (n=117).

Bacteria Indicadora	N° muestras positivas	% del total de muestras
Sólo <i>E. coli</i>	62	52,9
<i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i>	17	14,5
Sólo <i>Enterococcus</i>	11	9,4

Al hacer la diferenciación por especie de las 28 muestras de *Enterococcus* se identificaron 2 muestras de *E. faecalis* correspondientes a un 1,7%, sólo una muestra de *E. faecium* (0,9%) y las restantes 25 muestras se clasificaron como *Enterococcus spp.* y correspondieron a un 21,4%. La proporción establecida entre *E. faecalis* y *E. faecium* fue de 2: 1.

7.2. ASOCIACION DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS A LAS DISTINTAS VARIABLES (Anexo 1).

Cuadro N° 6. Número y porcentaje de muestras positivas a *E. coli* y *Enterococcus* de acuerdo a la provincia de origen de los bovinos (n=117).

PROVINCIAS	N° muestras	<i>E. coli</i> positivas		<i>Enterococcus</i> positivas	
		N°	%	N°	%
Valdivia	12	6	50,0	3	25,0
Osorno	54	36	66,7	12	22,2
Llanquihue	43	36	83,7	10	23,3
Coyhaique	8	1	12,5	3	37,5
TOTAL	117	79	-	28	-

Se encontraron diferencias ($p < 0,05$) de aislamientos de *E. coli* entre las muestras provenientes de las provincias de Valdivia y de Llanquihue. Las muestras provenientes de Coyhaique, por su parte, son diferentes ($p < 0,05$) con las muestras de las provincias de Osorno y Llanquihue. Todo esto para las muestras positivas a *E. coli*. En el caso de las muestras positivas a *Enterococcus* no hubo diferencias entre las provincias de origen ($p > 0,05$).

La cepa de *Enterococcus faecium* se aisló de un bovino procedente de la provincia de Osorno y las dos cepas de *Enterococcus faecalis* fueron aisladas de heces de bovinos procedentes de la provincia de Llanquihue.

Cuadro N° 7. Número y porcentaje de muestras positivas a *E. coli* y *Enterococcus* de acuerdo al sexo de los bovinos (n=117).

SEXO	N° muestras	<i>E. coli</i> positivas		<i>Enterococcus</i> positivas	
		N°	%	N°	%
Macho	64	45	70,3	13	20,3
Hembra	53	34	64,2	15	28,3
TOTAL	117	79	-	28	-

No hubo diferencias ($p > 0,05$) entre machos y hembras positivos a *E. coli* y tampoco entre los positivos a *Enterococcus*.

8. DISCUSION

La frecuencia de aislamiento de *Escherichia coli* en las muestras de heces de bovinos aparentemente sanos, analizadas en este estudio, resultó baja (67,5%) comparada con la frecuencia de presentación de 96% obtenida por Berge y col. (2003) en un estudio realizado en terneros. Esto refleja que el factor edad tiene cierta relación con la frecuencia de presentación, pero no es así ya que, según antecedentes bibliográficos, esta bacteria tiene como ubicación primaria el intestino de la gran mayoría de los animales de sangre caliente y del hombre y se describe específicamente el colon como sitio de permanencia y proliferación de la bacteria en rumiantes adultos (Rice y col, 1990; Jay, 1992; Grauke y col, 2002).

Es importante considerar que, por el hecho que las muestras fueron tomadas en la sala de vísceras verdes, el tiempo transcurrido entre el sacrificio del animal y la toma de muestras y de ahí hasta el análisis en el laboratorio, haya sido el suficiente para que la bacteria no sobreviviera, pero esto también se descarta porque son sólo algunos minutos lo que demoran las vísceras en llegar a la sala y éstas lo hacían en perfectas condiciones y sin previa manipulación. El traslado al laboratorio se hacía dentro de máximo una hora una vez terminada la toma de muestras y se hacía en un medio adecuado de transporte y a temperatura de refrigeración que permitía la mantención de la bacteria. Además, al ser *E. coli* una bacteria entérica, indicadora de contaminación fecal, su tasa de muerte es algo menor y resiste por más tiempo las condiciones extra-intestinales (Venegas y col, 1990).

La segunda bacteria aislada, *Enterococcus*, también se considera como un indicador de contaminación fecal, esto debido a su gran abundancia en heces (Manero y Blanch, 1999) principalmente en humanos en donde forma parte de la flora gastrointestinal normal aislándose en casi el 100% de las muestras de materia fecal (Hardie y Whiley, 1997; García-Garrote y col, 2000). En el caso de los animales, se describe que se encuentran en gran número en intestinos de mamíferos, aves y reptiles (Lukasova y Sustackova, 2003).

Como se observa en este trabajo la frecuencia de aislamiento de *Enterococcus* En el caso de los bovinos es muy baja. Sólo se logró un aislamiento de un 23,9% de las muestras de materia fecal. Algo similar señalan Devriese y col. (1992) quienes aislaron distintas especies de enterococos de heces de terneros pre-rumiantes, rumiantes y de vacas y concluyeron que la frecuencia de presentación en sí es baja y que disminuye aún más con la edad, siendo rara la presentación en vacas. Una baja frecuencia de presentación de *Enterococcus* se observa también en otro estudio en el cual se analizaron 392 cepas, provenientes de muestras de distintos animales, de las cuales sólo el 17,6% provenían de bovinos a diferencia de los ciervos, por ejemplo, que representaron el 33,4% de las muestras (Wheeler y col, 2002). Una tendencia similar se muestra en un estudio desarrollado por Devriese y col. (1987) en el cual se aislaron 264 cepas también provenientes de distintos animales; sólo el 17,1% de las cepas provenían de bovinos.

Al asociar los datos de aislamiento de *E. coli* vs *Enterococcus spp* en muestras de bovinos aparentemente sanos, se desprende que la relación es de 2,8:1, lo que significa que de cada tres muestras de materia fecal de bovinos en que se aísla *E. coli*, una resulta positiva a *Enterococcus spp*. Esta relación debería ser un poco mas alta, considerando que la frecuencia de presentación de *E. coli* en este estudio resultó baja.

La determinación del origen de la contaminación fecal, es decir, si ésta proviene de fuentes humanas o animales, es importante para el establecimiento de medidas efectivas de control, por esto históricamente se utilizaba la relación entre coliformes fecales (CF) y estreptococos fecales (EF) para hacer esta diferenciación. Feachem (1975) señala, dentro de los estreptococos fecales, a los enterococos como el grupo dominante en humanos y a *Streptococcus bovis* y *S. equinus* como las especies más abundantes en bovinos y cerdos. En cuanto a la sobrevivencia de estas bacterias señala que los enterococos sobreviven por más tiempo que los coliformes fecales y éstos más que *S. bovis* y *S. equinus*. Así, el mismo autor señala que una relación entre CF: EF inicialmente alta (>4) que va disminuyendo indicaría que la contaminación es humana (mayor sobrevivencia de enterococos), mientras que una relación baja al inicio (<0,7) que subsecuentemente sube sugeriría una contaminación no humana (mayor sobrevivencia de CF). Sin embargo estas mediciones indirectas están basadas en parámetros inestables y pueden, por lo tanto, llevar a conclusiones erróneas lo que ha llevado a que esta técnica ya no se use.

Actualmente se han probado varias técnicas para definir el origen de la contaminación fecal. Una prueba de ello es la utilización del ribotipeado (técnica de identificación de ADN) con el cual se obtuvo un rango correcto de clasificación en promedio de 97,1% al definir el origen humano o no humano de *E. coli* (Carson col, 2001). Otros métodos probados son, por ejemplo, el test de resistencia antibiótica múltiple, PCR, secuencias repetitivas de ADN, entre otros.

Al hacer la identificación de las especies *Enterococcus spp*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, se pudo concluir que la mayor cantidad de cepas correspondían a *Enterococcus spp*. (25) y que la relación establecida entre las otras dos especies favoreció levemente a *E. faecalis* por sobre *E. faecium* (con una relación de 2:1). En el estudio realizado por Devriese y col. (1987) se ve una tendencia similar, tanto en ganado bovino como en cerdos, perros, caballos y cabras. En otro estudio en que se analizaron vacas adultas, no se encontró *E. faecium* en ninguna de las muestras, la presentación de *E. faecalis* fue muy escasa y una cepa distinta de *Enterococcus* fue la más abundante, pero siempre en baja cantidad. En este mismo estudio, en terneros pre-rumiantes estudiados, *E. faecalis* también se presentó en mayor cantidad que *E. faecium* (Devriese y col, 1992).

Un resultado opuesto obtuvieron Wheeler y col (2002) frente al análisis de muestras de bovinos y de otros animales. En ese estudio se observa que *E. faecalis* tiene un rango limitado de hospedadores presentándose sólo en perros y pollos, a diferencia de *E. faecium* que estuvo presente en las muestras de todos los animales, en distintas cantidades, sin embargo, en bovinos esta especie no fue la más abundante.

En humanos la tendencia se repite ya que *E. faecalis* es la especie más comúnmente encontrada y en mayor número que *E. faecium* (Hardey y Whiley, 1997). Esto es corroborado en otro estudio en donde se aislaron distintas especies de enterococos a partir de muestras provenientes de humanos y del medio ambiente. En ambas fuentes de aislamiento, *E. faecalis* y *E. faecium* fueron las especies más abundantes y entre ellas, *E. faecalis* fue siempre más frecuente que *E. faecium* (Stern y col, 1994).

Con respecto a productos alimenticios de origen animal, se han aislado cepas de *Enterococcus* en leche, carne de bovino y pollo y se ha encontrado a *E. faecalis* como la bacteria más abundante siendo secundada por *E. faecium* (Chingwaru y col, 2003). Pavia y col (2000) también aislaron cepas de *Enterococcus* de carne de bovino, pollo, pavo, cordero y cerdo obteniendo resultados similares al estudio mencionado previamente, es decir, *E. faecalis* y *E. faecium* fueron las cepas más frecuentes, pero, en este caso, ambas se presentaron en igual cantidad.

La discrepancia de este trabajo con algunos de los estudios mencionados anteriormente es causada, probablemente, por el uso de técnicas distintas de aislamiento e identificación. En este estudio la identificación de las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* se realizó por medio de cinco pruebas bioquímicas elegidas de acuerdo a la precisión de los resultados. Otros métodos de identificación son el test API 20 Strep (Pavia y col, 2000; Chinwaru y col, 2003), sistema VITEK 2 (García-Garrote y col, 2000) entre otros.

No se ha descrito en la literatura ningún estudio que analice la frecuencia de presentación de *E. coli* y *Enterococcus*, a partir de materia fecal de bovinos, según la procedencia y sexo en Chile. Según los resultados arrojados en este estudio se puede decir que la provincia de Coyhaique revela una muy baja cantidad de muestras positivas a *E. coli* presentando diferencias significativas con las muestras de las provincias de Osorno y Llanquihue, pero estos resultados no son del todo concluyentes debido al bajo número de muestras provenientes de esa zona. La provincia de Valdivia también presenta un bajo porcentaje de muestras positivas a *E. coli* lo que se podría deber a algún factor que estuviera afectando a los animales de esa zona como la alimentación o bien algún tratamiento antibiótico lo que no correspondería ya que son muestras tomadas en una planta faenadora y, por ende, debiera existir un período de resguardo previo. Lo anterior se descarta al analizar la presentación de *Enterococcus* en las distintas provincias ya que no presentaron diferencias significativas y los porcentajes de muestras positivas son similares en cada provincia.

Con respecto a la frecuencia de presentación por sexo, los porcentajes de muestras positivas a *E. coli* son relativamente parejos y no presentan diferencias significativas, lo mismo ocurre para *Enterococcus*. En esta última llama la atención el porcentaje de muestras positivas levemente más alto que poseen las hembras (28,3%) por sobre los machos (20,3%) ya que, como lo señala Devriese y col. (1992), la presencia de *Enterococcus* en materia fecal de vacas es rara.

Con este estudio se puede concluir que la frecuencia de aislamiento de *Escherichia coli* de materia fecal de bovinos resultó más baja de lo que se describe en la literatura. En el caso de *Enterococcus* el aislamiento demostró la baja presencia de esta bacteria en materia fecal de bovinos adulto. La relación establecida entre ambas bacterias favoreció a *E. coli* lo que indica que esta bacteria sería un mejor indicador de contaminación fecal por su mayor abundancia.

De las 28 muestras de *Enterococcus*, dos fueron identificadas como *E. faecalis* y una como *E. faecium* lo que corresponde a un porcentaje muy bajo del total de muestras positivas a ese género.

En cuanto a la asociación de *E. coli* y *Enterococcus* al área de procedencia geográfica y al sexo de los animales faenados, se concluye que no hay relación entre la frecuencia del aislamiento y las variables consideradas.

En respuesta a la hipótesis planteada se establece que la frecuencia de aislamiento de *E. coli* fue de un 67,5% y de *Enterococcus* de 23,9%, ambos considerados bajos e independientes de la procedencia y sexo de los animales.

9. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M.R., M.O. MOSS. 2000. Food microbiology. 2nd ed. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- BANWART, G.J. 1979. Basic food microbiology. The Avi Publishing Company, Inc. Connecticut, USA.
- BERGE, A.C.B., E.R. ATWILL, W.M. SISCHO. 2003. Assessing antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* in young calves using cluster analysis techniques. *Prev. Vet. Med.* 61: 91-102.
- BEUCHAT, L.R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce, *J. Food. Prot.* 59: 204-216.
- BIBERSTEIN, E.L., Y.C. ZEE. 1994. Tratado de microbiología veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- BOGAARD van den, A.E., E.E. STOBBERINGH. 1999a. Antibiotic usage in animals. Impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*, 58: 589-607.
- BOGAARD van den, A.E., E.E. STOBBERINGH. 1999b. Contamination of animal feed by multiresistant enterococci. *Lancet*, 354: 163.
- BOURGEOIS, C.M., J.F. MESCLE, J. ZUCCA. 1994. Microbiología alimentaria, aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria, volumen 1. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- CARSON, C.A., B.L. SHEAR, M.R. ELLERSIECK, A. ASFAW. 2001. Identification of fecal *Escherichia coli* from human and animals by ribotyping. *Appl. Environm. Microbiol.* 67: 1503-1507.
- CARTER, M. 1984a. Enterobacteria. p: 92-110. *En* Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. G.R. Carter (ed). 4th ed. C. Thomas Publisher. Illinois, USA.
- CARTER, M. 1984b. *Streptococcus* and related cocci. p: 167-175. *En* Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. G.R. Carter (ed). 4th ed. C. Thomas Publisher. Illinois, USA.
- CASTAGNETO, H. 1980. Farmacología, guías teórico-prácticas. Antibioticoterapia. Ediciones Toray. Buenos Aires, Argentina.

- CHAMBERS, H.F. 2001. Antimicrobial agents, General considerations. p. 1143-1170. *En* J.G. Hardman, L.E. Limbird, A. Goodman Gilman (ed). Goodman & Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. M^cGraw-Hill. New York, USA.
- CHILE. 2001. Instituto Nacional de Normalización de Chile, norma 2636.
- CHILE. 2001. Instituto Nacional de Normalización de Chile, norma 2658.
- CHINGWARU, W., S.F. MPUCHANE, B.A. GASHE. 2003. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance. *J. Food Prot.* 66: 931-936.
- COWAN, S.T. 1974. Enterobacteriaceae. p. 290-296. *En* R. E. Buchanan, N. E. Gibbons (ed). Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins Company. Baltimore, USA.
- CULLOR, J.S. 1995. *Escherichia coli* O157: H7: The silent danger. *Vet. Med.* January: 74-82.
- DEVRIESE, L.A., A. VAN DE KERCKHOVE, R. KILPPER-BÄLZ, K.H. SCHLEIFER. 1987. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int. J. Syst. Microbiol.* 37: 257-259.
- DEVRIESE, L.A., L. LAURIER, P. DE HERDT, F. HAESEBROUCK. 1992. Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 29-31.
- DEVRIESE, L.A., B. POT, M.D. COLLINS. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399-408
- DOYLE, M.P., L.R. BEUCHAT, T.J. MONTVILLE. 1997. Food microbiology, fundamentals and frontiers. ASM Press. Washington. USA.
- FACKLAM, R.R., M.D. COLLINS. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27: 731-734.
- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2002. Bad bug book, Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. *Escherichia coli* O157: H7 (Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap15.html>. Consultado en: Noviembre de 2002).
- FEACHEM, R. 1975. An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water Res.* 9: 689-690.

- FORBES, B.A., D.F. SAHM, A.S. WEISSFELD. 1998. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 10th ed. Mosby. St. Louis, USA.
- FUENTES, V.O. 1992. Farmacología y terapéutica veterinaria. 2^a ed. Interamericana-M^cGraw-Hill. D.F México, México.
- GARCIA-GARROTE, F., E. CERCENADO, E. BOUZA. 2000. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2108-2111.
- GESCHE, E., C. EMILFORK. 1998. Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. *Arch. Med. Vet.*, 30: 137-143.
- GIRAFFA, G., D. CARMINATI, E. NEVIANI. 1997. Enterococci isolated from diary products: a review of risks and potential technological use. *J. Food. Prot.* 60: 732-738.
- GRAUKE, L.J., I.T. KUDVA, J.W. YOON, C.W. HUNT, C.J. WILLIAMS, C.J. HOVDE. 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157: H7 in ruminants, *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2269-2277.
- HARDIE, J.M., R.A. WHILEY. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*, *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement*, 83: 1S-11S.
- HARWOOD, V.J., M. BROWELL, W. PERUSEK, J.E. WHITLOCK. 2001. Vancomycin resistant *Enterococcus spp.* isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *Appl. Environm. Microbiol.* 67: 4930-4933.
- JAY, J.M. 1992. Microbiología moderna de los alimentos. 3^a ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- KATZUNG, B.G. 2001. Basic & Clinical Pharmacology. 8th ed. M^cGraw-Hill. New York, USA.
- KNUDTSON, L.M., P.A. HARTMAN. 1993. Antibiotic resistance among enterococcal isolates from environmental and clinical sources. *J. Food. Prot.* 56: 489-492.
- KRUZE, J. 1983. The aetiology of bovine mastitis caused by *Streptococcus uberis*. University of Reading, Microbiology department, National Institute for Research in Dairying, Shinfield, England.
- LEE, P. R., C. LIN. 2003. The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers. *Perspect. Biol. Med.* 46: 603.

- LINTON, A.H. 1983. Antibiotic resistance in veterinary practice. p. 129-141. *En* J. A. Bogan, P. Lees y A.T. Yoxall (ed). Pharmacological basis of large animal medicine. Blackwell Scientific Publications. Oxford. UK.
- LUKASOVA, J., A. SUSTACKOVA. 2003. Enterococci and antibiotic resistance. *Acta Vet. Brno.*, 72: 315-323.
- MACDONALD, K.L., M.J. O'LEARY, M.L. COHEN, P.NORRIS, J.G. WELLS, E.NOLL, J.M. KOBAYASHI, P.A. BLAKE. 1998. *Escherichia coli* O157: H7, an emerging gastrointestinal pathogen. *JAMA* 259: 3567-3570.
- MANERO, A., A.R. BLANCH. 1999. Identification of *Enterococcus spp.* with a biochemical key, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4425-4433.
- MARDONES, J. 1979. Farmacología. 2ª ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina.
- MERCHANT, I.A., R.A. PACKER. 1975. Bacteriología y virología veterinarias. 3ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- MURRAY, P.R., W.L. DREW, G.S. KOBAYASHI, J.L. THOMPSON. 1992. Microbiología médica. Mosby-year book. Barcelona, España.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1999. The use of drugs in food animals. Benefits and risks. National Academy Press. Washington D.C., USA.
- NEU, H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257: 1064-1073.
- OKOLO, M.I.O. 1986. Bacterial drug resistance in meat animals: a review. *Int. J. Zoon.* 13: 143-152.
- ÖSTERBLAD, M., A. HAKANEN, R. MANNINEN, T. LEISTEVUO, R. PELTONEN, O. MEURMAN, P. HUOVINEN, P. KOTILAINEN. 2000. A between-species comparison of antimicrobial resistance in enterobacteria in fecal flora. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1479-1484.
- PAVIA, M., C.G.A. NOBILE, L. SALPIETRO, I.F. ANGELILLO. 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Prot.* 63: 912-915.
- PRESCOTT, J.F., J.D. BAGGOT. 1988. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Blackwell Scientific Publications. Boston, USA.
- RADOSTITS, O.M., C.C. GAY, D.C. BLOOD, K.W. HINCHCLIFF. 2000. Veterinary medicine. A textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9th ed. W.B. Saunders. London, UK.

- REINERT, R.R., G. CONRADS, J.J. SCHLAEGER, G. WERNER, W. WITTE, R. LÜTTICKEN, I. KLARE. 1999. Survey of antibiotic resistance among enterococci in North Rhine-Westphalia, Germany. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1638-1641.
- RICE, E.W., M.J. ALLEN, S.C. EDBERG. 1990. Efficacy of β -glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the define-substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1203-1205.
- ROBINSON, R.K., C.A. BATT, R.D. PATEL. 2000. Encyclopedia of food microbiology. Academic Press. London, UK.
- SNEATH, P.H.A., N.S. MAIR, M.E. SHARPE, J.G. HOLT. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- SOLOMON, E.B., S. YARON, K.R. MATTHEWS. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157: H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 397-400.
- STERN, C.S., M.G. CARVALHO, L.M. TEIXEIRA. 1994. Characterization of enterococci isolated from human and nonhuman sources in Brazil, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 6-17.
- TYRRELL, G.J., L. TURNBULL, L.M. TEIXEIRA, J. LEFEBVRE, M.S. CARVALHO, R.R. FACKLAM, M. LOVGREN. 2002. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1140-1145.
- VENEGAS, N., E. MARAMBIO, M. INSUNZA, A. SOTO, A. ARRIETA. 1990. Control microbiológico de los alimentos – técnicas actualizadas y métodos acelerados. Universidad de Chile.
- WANAMAKER, B.P., C.L. PETTES. 2000. Applied pharmacology for the veterinary technician. 2nd ed. W.B. Saunders. St. Louis, USA.
- WHEELER, A.L., P.G. HARTEL, D.G. GODFREY, J.L. HILL, W.I. SEGARS. 2002. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ. Qual.* 31: 1286-1293.
- YILMAZ, A., H. GUN, H. YILMAZ. 2000. Frequency of *Escherichia coli* O157: H7 in turkish cattle, *J. Food Prot.* 65: 1637-1640.

10. ANEXOS

1. caracterización y descripción de las 117 muestras de materia fecal de bovinos para el aislamiento de *E. coli* y *Enterococcus*.

N°	PROVINCIA	SEXO	RAZA	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. spp</i>
1	Valdivia	Macho	ND	+	-	-	-
2	Valdivia	Macho	ND	+	-	-	-
3	Valdivia	Macho	ND	+	-	-	-
4	Valdivia	Macho	ND	+	-	-	-
5	Valdivia	Macho	ND	+	-	-	-
6	Valdivia	Macho	ND	+	-	-	-
7	Llanquihue	Macho	ND	+	-	-	-
8	Llanquihue	Macho	ND	+	-	-	-
9	Llanquihue	Macho	ND	+	-	-	-
10	Llanquihue	Macho	ND	-	-	-	-
11	Llanquihue	Macho	ND	+	-	-	-
12	Llanquihue	Macho	ND	-	-	-	+
13	Llanquihue	Macho	ND	+	-	-	+
14	Llanquihue	Macho	ND	+	-	-	-
15	Llanquihue	Macho	ND	+	-	-	-
16	Osorno	Hembra	ND	+	-	-	-
17	Osorno	Hembra	ND	+	-	-	-
18	Osorno	Hembra	ND	+	-	-	-
19	Osorno	Hembra	ND	-	-	-	-
20	Llanquihue	Macho	He	+	-	-	-
21	Llanquihue	Macho	He	+	-	-	+
22	Llanquihue	Macho	He	+	-	-	-
23	Llanquihue	Macho	He	+	-	-	+
24	Llanquihue	Macho	He	+	-	-	+
25	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
26	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
27	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
28	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
29	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
30	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
31	Osorno	Hembra	HF	+	-	-	+
32	Osorno	Hembra	HF	+	-	-	+
33	Osorno	Hembra	HF	+	-	-	-
34	Osorno	Hembra	HF	+	-	-	-
35	Osorno	Hembra	HF	+	-	+	-
36	Osorno	Macho	FR	-	-	-	-
37	Osorno	Macho	FR	+	-	-	-
38	Osorno	Macho	FR	+	-	-	-
39	Osorno	Macho	FR	+	-	-	-
40	Osorno	Macho	FR	-	-	-	-

N°	PROVINCIA	SEXO	RAZA	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. spp</i>
41	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
42	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	+
43	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
44	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
45	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
46	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
47	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
48	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
49	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
50	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
51	Osorno	Macho	FN	+	-	-	-
52	Osorno	Macho	FN	+	-	-	+
53	Osorno	Macho	FN	+	-	-	+
54	Osorno	Macho	FN	+	-	-	-
55	Osorno	Macho	FN	+	-	-	+
56	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
57	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
58	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
59	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
60	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
61	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
62	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	+
63	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
64	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	-
65	Llanquihue	Macho	FN	+	-	-	+
66	Llanquihue	Hembra	FN	+	-	-	-
67	Llanquihue	Hembra	FN	-	-	-	-
68	Llanquihue	Hembra	FN	+	-	-	+
69	Llanquihue	Hembra	FN	+	-	-	-
70	Llanquihue	Hembra	FN	+	-	-	-
71	Osorno	Hembra	FR	+	-	-	-
72	Osorno	Hembra	FR	+	-	-	-
73	Osorno	Hembra	FR	+	-	-	-
74	Osorno	Hembra	FR	-	-	-	-
75	Osorno	Hembra	FR	+	-	-	+
76	Osorno	Macho	FR	+	-	-	-
77	Osorno	Macho	FR	-	-	-	-
78	Osorno	Macho	FR	+	-	-	-
79	Osorno	Macho	FR	+	-	-	-
80	Osorno	Macho	FR	-	-	-	-
81	Valdivia	Hembra	FN	-	-	-	-
82	Valdivia	Hembra	FN	-	-	-	+
83	Valdivia	Hembra	FN	-	-	-	-
84	Valdivia	Hembra	FN	-	-	-	-
85	Valdivia	Hembra	FN	-	-	-	+
86	Valdivia	Hembra	FN	-	-	-	+
87	Osorno	Macho	FN	-	-	-	-
88	Osorno	Macho	FN	-	-	-	-

N°	PROVINCIA	SEXO	RAZA	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. spp</i>
89	Osorno	Macho	FN	-	-	-	-
90	Osorno	Macho	FN	-	-	-	-
91	Osorno	Macho	FN	-	-	-	-
92	Osorno	Macho	FN	-	-	-	-
93	Llanquihue	Hembra	FN	+	-	-	-
94	Llanquihue	Hembra	FN	-	+	-	-
95	Llanquihue	Hembra	FN	+	-	-	-
96	Llanquihue	Hembra	FN	-	-	-	-
97	Llanquihue	Hembra	FN	+	-	-	-
98	Llanquihue	Hembra	FN	+	-	-	-
99	Llanquihue	Hembra	FN	-	-	-	-
100	Llanquihue	Hembra	FN	-	-	-	-
101	Coyhaique	Macho	FR	-	-	-	-
102	Coyhaique	Macho	FR	-	-	-	-
103	Coyhaique	Macho	FR	+	-	-	+
104	Coyhaique	Macho	FR	-	-	-	-
105	Coyhaique	Macho	FR	-	-	-	-
106	Coyhaique	Macho	FR	-	-	-	-
107	Coyhaique	Macho	FR	-	-	-	+
108	Coyhaique	Macho	FR	-	+	-	-
109	Osorno	Hembra	FN	-	-	-	+
110	Osorno	Hembra	FN	-	-	-	+
111	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
112	Osorno	Hembra	FN	-	-	-	-
113	Osorno	Hembra	FN	-	-	-	+
114	Osorno	Hembra	FN	-	-	-	-
115	Osorno	Hembra	FN	-	-	-	+
116	Osorno	Hembra	FN	+	-	-	-
117	Llanquihue	Hembra	FR	+	-	-	+

11. AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Ivonne y Roberto, a mis hermanos, cuñados y familia por el esfuerzo puesto en el largo camino para llegar a esta instancia, por el enorme cariño entregado, el apoyo y la ayuda dada.

A David Ergas por su apoyo incondicional, sus consejos, fuerza y confianza transmitidos durante la realización de este trabajo y a través de toda la carrera.

A Dra. Erika Gesche y Mónica Saez por sus conocimientos y las oportunidades dadas, por la gran paciencia, disposición, apoyo y fundamental ayuda.

A Rodrigo C., Claudia C., Eva B. y amigos por hacer que el trabajo realizado haya sido más ameno y entretenido, por la compañía, preocupación y los buenos momentos compartidos.

A Bernarda, Irma y Vivi por toda la ayuda brindada, la inagotable paciencia, buena disposición, la compañía y todos los buenos momentos.

Al personal de la Planta Faenadora de Carnes del Sur por la ayuda en la recolección de datos y muestras, por la paciencia y buena disposición.